

ANSWER 10 OF 17 CAPLUS COPYRIGHT 2006 ACS on STN

AN 1999:471954 CAPLUS

DN 131:141735

ED Entered STN: 02 Aug 1999

TI Method of immunoassay reagent preparation and immunoassay

IN Kono, Ryoko; Takahara, Makoto; Kuroda, Hiroshi

PA Sekisui Chemical Co. Ltd., Japan

SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 8 pp.

CODEN: JKXXAF

DT Patent

LA Japanese

IC ICM G01N033-531

ICS G01N033-543

CC 9-10 (Biochemical Methods)

Section cross-reference(s): 15

FAN.CNT 1

	PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
PI	JP 11201970	A	19990730	JP 1998-305521	19981027 <--
PRAI	JP 1997-300264	A	19971031		

CLASS

	PATENT NO.	CLASS	PATENT FAMILY CLASSIFICATION CODES
	JP 11201970	ICM	G01N033-531
		ICS	G01N033-543
		IPCI	G01N0033-531 [ICM,6]; G01N0033-543 [ICS,6]
		IPCR	G01N0033-531 [I,A]; G01N0033-531 [I,C*]; G01N0033-543 [I,A]; G01N0033-543 [I,C*]

AB Insol. carriers are sensitized with antibody or antigen, treated with blocking agent, and incubated with non-immunoreactive protein and/or hydrolysis product of the non-immunoreactive protein to reduce background (non-specific binding) and largely increase specific signal for immunoassay. Thus, latex particles sensitized with hepatitis B surface antigen (HBs) and treated with bovine serum albumin (BSA) were prepared for detecting anti-HBs antibody in human blood serum. Also, polystyrene latex particles sensitized with anti- α -fetoprotein antibody and treated with BSA were prepared for detecting α -fetoprotein in the sera of hepatoma patients.

ST immunoassay latex antigen antibody albumin blocking

IT Antigens

RL: ARG (Analytical reagent use); BSU (Biological study, unclassified); THU (Therapeutic use); ANST (Analytical study); BIOL (Biological study); USES (Uses)

(hepatitis B surface; method of immunoassay reagent preparation and immunoassay)

IT Liver, neoplasm

(hepatoma; method of immunoassay reagent preparation and immunoassay)

IT Reagents

RL: ARG (Analytical reagent use); BSU (Biological study, unclassified); THU (Therapeutic use); ANST (Analytical study); BIOL (Biological study); USES (Uses)

(immunoassay; method of immunoassay reagent preparation and immunoassay)

IT Carriers

(insol.; method of immunoassay reagent preparation and immunoassay)

IT Blood serum

Immunoassay

Latex

(method of immunoassay reagent preparation and immunoassay)

IT Antibodies

Antigens

RL: ANT (Analyte); ARG (Analytical reagent use); BSU (Biological study, unclassified); THU (Therapeutic use); ANST (Analytical study); BIOL (Biological study); USES (Uses)

- (method of immunoassay reagent preparation and immunoassay)
- IT α -Fetoproteins
RL: ANT (Analyte); BSU (Biological study, unclassified); THU (Therapeutic use); ANST (Analytical study); BIOL (Biological study); USES (Uses)
(method of immunoassay reagent preparation and immunoassay)
- IT Proteins, specific or class
RL: ARU (Analytical role, unclassified); THU (Therapeutic use); ANST (Analytical study); BIOL (Biological study); USES (Uses)
(non-immunoreactive; method of immunoassay reagent preparation and immunoassay)
- IT Albumins, analysis
RL: ARU (Analytical role, unclassified); THU (Therapeutic use); ANST (Analytical study); BIOL (Biological study); USES (Uses)
(serum, bovine; method of immunoassay reagent preparation and immunoassay)
- IT 9003-53-6, Polystyrene
RL: ARU (Analytical role, unclassified); THU (Therapeutic use); ANST (Analytical study); BIOL (Biological study); USES (Uses)
(latex; method of immunoassay reagent preparation and immunoassay)

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-201970

(43)公開日 平成11年(1999)7月30日

(51)Int.Cl.⁶

G 0 1 N
33/531
33/543

識別記号

5 8 1

F I

G 0 1 N
33/531
33/543

Z

5 8 1 W
5 8 1 G
5 8 1 U

審査請求 未請求 請求項の数4 OL (全8頁)

(21)出願番号	特願平10-305521	(71)出願人	000002174 積水化学工業株式会社 大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号
(22)出願日	平成10年(1998)10月27日	(72)発明者	河野 良子 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学 工業株式会社内
(31)優先権主張番号	特願平9-300264	(72)発明者	高原 誠 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学 工業株式会社内
(32)優先日	平9(1997)10月31日	(72)発明者	黒田 広志 大阪府三島郡島本町百山2-1 積水化学 工業株式会社内
(33)優先権主張国	日本 (JP)		

(54)【発明の名称】 免疫測定試薬の製造方法および免疫測定法

(57)【要約】

【課題】 特異的なシグナルの大きさを減ずることなく、バックグラウンド・シグナルを低減することにより低濃度の領域まで高感度に測定可能な免疫測定試薬の製造方法および得られた免疫測定試薬を用いる免疫測定法を提供する。

【解決手段】 不溶性担体（例、ラテックス粒子）に被測定物質である抗原〔または抗体（例、HBs抗体）〕に対応する抗体〔または抗原（例、HBs抗原）〕を作成した後、該不溶性担体をブロッキング処理し、次いで、免疫学的に不活性なタンパク質（例、ウシ血清アルブミン）、及び／または、免疫学的に不活性なタンパク質の加水分解物を含む溶液中でインキュベーション（例、37°C、7日）することを特徴とする免疫測定試薬の製造方法。上記の製造方法によって得られた免疫測定試薬と被測定物質含有試料とを接触させ、免疫測定試薬と被測定物質との抗原抗体反応により生じた不溶性担体の凝集の度合いを検出することにより、被測定物質を測定することを特徴とする免疫測定法。

1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 不溶性担体に被測定物質である抗原（または抗体）に対応する抗体（または抗原）を感作した後、該不溶性担体をブロッキング処理し、次いで、免疫学的に不活性なタンパク質、及び／または、免疫学的に不活性なタンパク質の加水分解物を含む溶液中でインキュベーションすることを特徴とする免疫測定試薬の製造方法。

【請求項2】 インキュベーション時の温度が30～40°Cであることを特徴とする請求項1記載の免疫測定試薬の製造方法。

【請求項3】 被測定物質である抗原（または抗体）に対応する抗体（または抗原）が、HBs抗原または抗ヒトα-フェトプロテイン抗体であることを特徴とする請求項1又は2記載の免疫測定試薬の製造方法。

【請求項4】 請求項1～3のいずれか一項記載の製造方法によって得られた免疫測定試薬と被測定物質含有試料とを接触させ、免疫測定試薬と被測定物質との抗原抗体反応により生じた不溶性担体の凝集の度合いを検出することにより、被測定物質を測定することを特徴とする免疫測定法。 20

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、不溶性担体を使用した免疫凝集反応に基づいて被測定物質を測定するために用いられ、低濃度の範囲まで信頼性良く測定可能な免疫測定試薬の製造方法および得られた免疫測定試薬を用いる免疫測定法に関する。

【0002】

【従来の技術】体液中の微量成分等の測定法のひとつとして、目的とする被測定物質である抗原（または抗体）に対応する抗体（または抗原）を不溶性担体に感作させ、被測定物質との抗原抗体反応により生じた不溶性担体の凝集の度合いを検出することにより、被測定物質を測定する方法がある。このような測定法としては、ラテックス凝集反応、赤血球凝集反応等が知られている。

【0003】この凝集の程度を検出する方法としては、凝集の有無を肉眼で判定する方法と、反応液に光を照射して散乱光または透過光を測定する光学的な方法がある。光学的な測定方法は、より精度が高いため、試料中の抗原（または抗体）の定量に用いられている。

【0004】上記凝集反応において、目的とする被測定物質が存在しない場合でも、非特異的凝集反応などによってある程度の散乱光または透過光などのシグナルが存在し、このシグナルによって被測定物質の低濃度領域の測定値が不正確になるという問題があった。このシグナルはバックグラウンド・シグナルと呼ばれるが、このバックグラウンド・シグナルを下げる方法として、反応液中に塩化コリン等の第4級アンモニウム塩やトリアルキルアミンおよびその塩などの水溶性化合物を添加する方

法が提案されている（特開昭62-218866号公报）。しかし、この方法はバックグラウンド・シグナルを低下させるが、同時に特異的なシグナルも低下させてしまうという問題があった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、特異的なシグナルの大きさを減することなく、バックグラウンド・シグナルを低減することにより低濃度の領域まで高感度に測定可能な免疫測定試薬の製造方法および得られた免疫測定試薬を用いる免疫測定法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】請求項1記載の発明は、不溶性担体に被測定物質である抗原（または抗体）に対応する抗体（または抗原）を感作した後、該不溶性担体をブロッキング処理し、次いで、免疫学的に不活性なタンパク質、及び／または、免疫学的に不活性なタンパク質の加水分解物を含む溶液中でインキュベーションすることを特徴とする免疫測定試薬の製造方法である。

【0007】請求項2記載の発明は、インキュベーション時の温度が30～40°Cであることを特徴とする請求項1記載の免疫測定試薬の製造方法である。

【0008】請求項3記載の発明は、被測定物質である抗原（または抗体）に対応する抗体（または抗原）が、HBs抗原または抗ヒトα-フェトプロテイン抗体であることを特徴とする請求項1又は2記載の免疫測定試薬の製造方法である。

【0009】請求項4記載の発明は、請求項1～3のいずれか一項記載の製造方法によって得られた免疫測定試薬と被測定物質含有試料とを接触させ、免疫測定試薬と被測定物質との抗原抗体反応により生じた不溶性担体の凝集の度合いを検出することにより、被測定物質を測定することを特徴とする免疫測定法である。

【0010】なお、本明細書において、上記の抗原（または抗体）、或いは、抗体（または抗原）という表現は、一文章中において、括弧内は括弧内同士が対応し、括弧外は括弧外同士が対応しているものとする。

【0011】本発明の製造方法による免疫測定試薬によって測定されるべき被測定物質は特に限定されず、一般に抗原抗体反応を利用して測定し得る物質はいずれも測定可能である。被測定物質の例としては、タンパク質、脂質等が挙げられ、より詳しくは、例えば、各種抗原、抗体、レセプター、酵素等が挙げられる。具体的には、ヒトC反応性たんぱく（CRP）、ヒトフィブリノーゲン、リウマチ因子、ヒトα-フェトプロテイン（AFP）、抗ストレアトリジンO抗体、梅毒トレボネーマ抗体、梅毒脂質抗原に対する抗体、HBs抗体、HBs抗原、HBc抗体、HBc抗体等が例示される。

【0012】以下、本発明の免疫測定試薬の製造方法について詳述する。本発明では、まず、不溶性担体に被測定

物質である抗原（または抗体）に対応する抗体（または抗原）を感作する。上記感作とは、不溶性担体に被測定物質である抗原（または抗体）に対応する抗体（または抗原）を結合させることである。上記結合方法としては、公知の物理的吸着による方法、化学的反応による結合などいすれでもよく、感作方法は從来公知の方法でよい。

【0013】上記感作において抗体が用いられる場合、用いる抗体としては免疫グロブリンまたはその断片である、例えば、 Fab 、 Fab' 、 $F(ab')などが挙げられる。$

【0014】本発明で用いられる不溶性担体としては、有機高分子粒子、無機物質粒子、微生物、血球および細胞膜片等が挙げられる。

【0015】上記有機高分子粒子としては、ラテックス粒子、不溶性アガロース、セルロース、不溶性デキストラン等が例示でき、特にラテックス粒子が好ましい。上記ラテックス粒子としては、從来からこの分野で使用されてきたもののいずれも使用可能であり、例えば、ポリスチレン、ポリメタクリル酸、ポリアクリル酸、スチレン-スチレンスルホン酸塩共重合体、アクリロニトリル-ブタジエン-スチレン共重合体、塩化ビニル-アクリル酸エステル共重合体、酢酸ビニル-アクリル酸エステル共重合体などからなるものが挙げられる。

【0016】用いるラテックス粒子の平均粒径は、被測定物質の検出濃度または測定機器によって0.05～1.0 μm の範囲で適宜選択される。

【0017】上記無機物質粒子としてはシリカ、アルミニナ等や、金、チタン、鉄、ニッケルのような金属片等が例示される。

【0018】本発明では、上記感作の後、得られた不溶性担体をブロッキング処理する。ブロッキング処理とは、被測定物質である抗原（または抗体）に対応する抗体（または抗原）を感作した不溶性担体を、測定しようとする試料中の被測定物質である抗原（または抗体）やそれ以外の物質と免疫学的に反応性を持たないタンパク質（以下、このタンパク質のことを免疫学的に不活性なタンパク質という）と接触させて、上記の抗体（または抗原）を感作した不溶性担体表面の上記の抗体（または抗原）が未だ結合せずに残っている部位に、上記の免疫学的に反応性を持たないタンパク質を結合させることであり、この処理は上記感作不溶性担体の非特異的反応を防止するために行うものである。このブロッキング処理は、不溶性担体を用いる免疫測定試薬の製造において、通常、頻繁に行われる操作であり、本発明においてもブロッキング処理の方法については公知の方法と同様である。

【0019】上記免疫学的に不活性なタンパク質としては、特に限定されないが、例えば、ウシ血清アルブミン等が挙げられる。

【0020】本発明では、上記ブロッキング処理後の不溶性担体を、次いで、免疫学的に不活性なタンパク質、及び／または、その加水分解物を含む溶液中でインキュベーションする。インキュベーションとは、一定温度の雰囲気中に静置しておく処理のことをいう。インキュベーションの温度は、25～45°Cが好ましく、より好ましくは25～40°Cであり、さらに好ましくは30～40°Cである。インキュベーションの時間は、24時間以上が好ましく、より好ましくは48時間以上である。本発明では、インキュベーションに次いで得られた不溶性担体を洗浄するのが好ましい。なお、この洗浄操作は、インキュベーションの前、すなわちブロッキング処理後でもよい。以上の処理により、本発明の製造方法による免疫測定試薬が得られる。

【0021】上記免疫学的に不活性なタンパク質としては、特に限定されないが、例えば、ウシ血清アルブミンやカゼインが挙げられる。また、免疫学的に不活性なタンパク質の加水分解物としては、例えば、カゼインの加水分解物であるカゼミノ酸を用いるのが好適である。

【0022】上記不溶性担体に、抗ヒト α -フェトプロテイン抗体を感作させた場合においては、上記ブロッキングを行ったあと、カゼミノ酸を0.5～2% (W/V) 含有する溶液中、30～40°Cでインキュベーションするのが好ましい。

【0023】次に、本発明の免疫測定法について詳述する。本発明の免疫測定法は、本発明の製造方法によって得られた免疫測定試薬と被測定物質含有試料とを接触させ、免疫測定試薬と被測定物質との抗原抗体反応により生じた不溶性担体の凝集の度合いを検出することにより、被測定物質を測定する。

【0024】本発明の免疫測定法の測定系は、例えば、ラテックス凝集反応や血球凝集法等の凝集法である。

【0025】上記被測定物質含有試料としては、特に限定されないが、例えば、血清、血漿、尿などの体液が挙げられる。

【0026】上記抗原抗体反応の条件は、通常の条件と同様であってよく、反応媒体としては、被測定物質の種類に応じた各種緩衝液が適宜選ばれる。この緩衝液は、被測定物質を失活させることなく、かつ抗原抗体反応を阻害しないようなイオン濃度やpHを有するものであればよい。例えば、リン酸緩衝液、グリシン緩衝液、トリス緩衝液が使用される。反応のpHは、5～10、特に6～8が好ましい。反応温度は0～50°C、特に20～40°Cが好ましい。反応時間は適宜決められる。反応時には、さらに測定系の特異性を高めるために從来から免疫凝集測定試薬の分野で用いられる、EDTA、ポリアニオン、カオトロピックイオン ($C1^-$ 、 I^- 、 SCN^- 等)、ゼラチンなどを添加することも可能である。また、ポリエチレングリコール、デキストランなどの反応促進剤を添加してもよい。

【0027】上記反応後の不溶性担体の凝集の度合いを検出するには、光学的に観察もしくは目視観察することにより行われる。具体的には、不溶性担体の凝集の程度を光学的に検出する方法においては、散乱光強度、吸光度または透過光強度を測定する光学機器を用いて測定する。好ましい測定波長は300~2400nmである。測定方法は、公知の方法に従い、用いる不溶性担体の大きさ、または濃度の選択、反応時間の設定により散乱光強度、吸光度または透過光強度の増加もしくは減少を測定することにより行われる。また、これらの方法を併用することも可能である。

【0028】不溶性担体の凝集の程度を肉眼で判定する試薬においては、通常、測定すべき試料と感作不溶性担体を含む溶液を判定板上で混合し、1~5分間振り動かした後、凝集の有無を判定する。凝集判定には、単に肉眼判定以外に、凝集状態をビデオカメラで撮影し、画像処理を施すことも可能である。

【0029】

【発明の実施の形態】以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

【0030】以下実施例1・2において、HBs抗体測定試薬の製造方法およびHBs抗体測定方法の場合における本発明の実施例について説明する。

【0031】実施例1 (HBs抗体測定試薬の製造方法およびHBs抗体測定方法)

(1) HBs抗原感作ラテックス液の調製

HBs抗原を2.0mg/mlの濃度で36mMのリン酸緩衝液(pH6.6)に溶解した液7.5mlに、平均粒径が0.3μmのポリスチレンラテックス(固体分10% (W/V)、積水化学工業社製)1mlを添加し、30℃にて60分間攪拌した。次いで、この液にウシ血清アルブミン(以下「BSA」という)を1重量%含有する100mMのリン酸緩衝液(pH8.0)を8.5ml添加し、30℃にて60分間攪拌した後、4℃にて20分間、18000rpmで遠心分離した。得られた沈殿物にBSAを0.5重量%含有する100mMのリン酸緩衝液(pH8.0)20mlを添加し、ラテックスを懸濁させた。この液を30℃にて7日間インキュベーションし、HBs抗原感作ラテックス液を調製した。

【0032】(2) 検体希釈用液の調製

BSAを1重量%含有する50mMのリン酸緩衝液(pH7.0)に、平均分子量50万のポリエチレングリコールを、1.0重量%の濃度になるように溶解した。

【0033】(3) HBs抗体測定試薬

本実施例のHBs抗体測定試薬は、上記(1)項のHBs抗原感作ラテックス液からなる第1試薬と、上記(2)項の検体希釈用液からなる第2試薬とから構成される2液型の試薬である。

【0034】(4) 標準HBs抗体液

HBs抗体を0、150、300、600、1200mIU/ml濃度で含むヒト血清を標準品として使用した。

【0035】(5) 測定方法

(5-1) 検量線の作成方法

上記(4)項の標準HBs抗体液20μlと上記(2)項の検体希釈用液120μlとを混合し、37℃で適時保持した後、上記(1)項のHBs抗原感作ラテックス液120μlを添加攪拌した。この後、1分後及び5分後の波長750nmでの吸光度を測定し、この差を吸光度変化量(ΔAbs)とした。測定は、日立自動分析装置7150形を使用した。標準HBs抗体液の濃度と得られたΔAbsの値を表1に、標準HBs抗体液の濃度と得られたΔAbsの関係を示す検量線を図1に示した。

(5-2) 検体の測定方法

上記(5-1)項における、標準HBs抗体液20μlの代わりに、検体20μlを使用したことの他は、(5-1)項と同様に操作し、得られた検体の吸光度変化量を上記検量線に外挿して、検体中のHBs抗体量を算出した。

【0036】(6) 検体の測定

HBs抗体陽性の血清20種類及び陰性の血清10種類を検体として、上記の測定方法に従って、HBs抗体量を測定した。結果を表2に示した。なお、表2には、上記検体を、酵素免疫測定法試薬である、エンザイグノストAnti-HBs micro(ヘキストジャパン社製)を用い、該キットの能書に従って測定および判定した結果も示した。

【0037】実施例2

実施例1における(1)HBs抗原感作ラテックス液の調製の項を、次のようにして行ったことを除いては、実施例1と同様にして、HBs抗体測定試薬を作成した。

【0038】HBs抗原を2.0mg/mlの濃度で36mMのリン酸緩衝液(pH6.6)に溶解した液7.5mlに、平均粒径が0.3μmのポリスチレンラテックス(固体分10% (W/V)、積水化学工業社製)1mlを添加し、30℃にて60分間攪拌した。次いで、

40 この液にBSAを1重量%含有するリン酸緩衝液(pH8.0)を添加し、30℃にて60分間攪拌した後、4℃にて20分間、18000rpmで遠心分離した。得られた沈殿物にBSAを0.5重量%含有する100mMのリン酸緩衝液(pH8.0)20mlを添加し、ラテックスを懸濁させた。この液を37℃にて7日間インキュベーションし、HBs抗原感作ラテックス液を調製した。

【0039】得られたHBs抗原感作ラテックス液を用いて、実施例1と同様にして検量線の作成と、検体中の50 HBs抗体量を測定し、結果をそれぞれ表1、図1、表

2に示した。

【0040】比較例1

実施例1における(1)HBs抗原感作ラテックス液の調製の項を、次のようにして行ったことを除いては、実施例1と同様にして、HBs抗体測定試薬を作成した。
【0041】HBs抗原を2.0mg/mlの濃度で36mMのリン酸緩衝液(pH6.6)に溶解した液7.5mlに、平均粒径が0.3μmのポリスチレンラテックス(固形分10%(W/V)、積水化学工業社製)1mlを添加し、30℃にて60分間攪拌した。次いで、この液にBSAを1重量%含有するリン酸緩衝液(pH8.0)を添加し、30℃にて60分間攪拌した後、4℃にて20分間、18000rpmで遠心分離した。得られた沈殿物にBSAを0.5重量%含有する100mMのリン酸緩衝液(pH8.0)20mlを添加し、ラテックスを懸濁させ、HBs抗原感作ラテックス液を調製した。

【0042】得られたHBs抗原感作ラテックス液を用いて、実施例1と同様にして検量線の作成と、検体中の*

*HBs抗体量を測定し、結果をそれぞれ表1、図1、表2に示した。

【0043】比較例2

実施例1における(1)HBs抗原感作ラテックス液の調製の項を、比較例1のHBs抗原感作ラテックス液の調製と同様に行なったこと、(2)検体希釈用液の調製の項を、次のようにして行ったことを除いては、実施例1と同様にして、HBs抗体測定試薬を作成した。BSAを1重量%含有する50mMのリン酸緩衝液(pH7.0)に、平均分子量50万のポリエチレングリコールを1.0重量%、および塩化コリンが0.5Mの濃度になるように溶解した。

【0044】得られたHBs抗原感作ラテックス液および検体希釈用液を用いて、実施例1と同様にして検量線の作成と、検体中のHBs抗体量を測定し、結果をそれぞれ表1、図1、表2に示した。

【0045】

【表1】

HBs抗体 (mIU/ml)	ΔAbs (750nm)			
	実施例1 30℃ 7日 インキュベーション	実施例2 37℃ 7日 インキュベーション	比較例1 インキュベーションせず	比較例2 塩化コリン 添加
0	0.0138	0.0061	0.0308	0.0156
150	0.0789	0.0707	0.0802	0.0558
300	0.1417	0.1382	0.1393	0.1074
600	0.2347	0.2348	0.2204	0.1892
1200	0.3223	0.3284	0.3006	0.2456

【0046】

※※【表2】

9

10

検体 番号	E I A 法 * 1	実施例 1		実施例 2		比較例 1		比較例 2	
		mIU/ml	判定 * 2						
1	-	0	-	0	-	0	-	0	-
2	-	0	-	0	-	0	-	0	-
3	-	0	-	0	-	1	-	0	-
4	-	7	-	6	-	10	-	0	-
5	-	2	-	0	-	2	-	6	-
6	-	0	-	0	-	0	-	0	-
7	-	3	-	9	-	5	-	9	-
8	-	8	-	10	-	21	-	2	-
9	-	0	-	0	-	1	-	1	-
10	-	0	-	0	-	0	-	0	-
11	+	30	+	33	+	35	+	28	+
12	+	28	+	26	+	20	-	23	-
13	+	31	+	34	+	30	+	29	+
14	+	25	+	28	+	24	-	24	-
15	+	41	+	45	+	40	+	39	+
16	+	39	+	43	+	38	+	37	+
17	+	52	+	57	+	49	+	49	+
18	+	38	+	42	+	37	+	36	+
19	+	27	+	30	+	21	-	25	+
20	+	33	+	41	+	38	+	35	+
21	+	221	+	228	+	232	+	244	+
22	+	340	+	350	+	351	+	343	+
23	+	489	+	504	+	514	+	528	+
24	+	572	+	589	+	601	+	627	+
25	+	514	+	530	+	523	+	525	+
26	+	893	+	920	+	938	+	919	+
27	+	991	+	1021	+	1032	+	997	+
28	+	605	+	623	+	600	+	630	+
29	+	782	+	806	+	802	+	813	+
30	+	499	+	514	+	524	+	515	+

* 1) エンザイグノスト Anti-HBs micro (ヘキストジャパン社製) を用い、該キットの能率に従って測定および判定した結果である。

- : 隆性、+ : 陽性

* 2) - : 隆性 (25 mIU/ml 未満) 、+ : 陽性 (25 mIU/ml 以上)

【0047】表1、2および図1より、ブロッキング後の感作ラテックスをインキュベーションすることにより低濃度まで高感度に測定可能であることが分かる。

【0048】以下実施例3～5において、 AFP測定試薬の製造方法および AFP測定方法の場合における本発明の実施例について説明する。

【0049】実施例3 (AFP測定試薬の製造方法および AFP測定方法)

(1) 試薬および材料

ラテックス：平均粒径が0.304 μmのポリスチレンラテックス（固形分10% (W/V) 、積水化学工業社製）を用いた。

ラテックス希釈用緩衝液：50 mMのNa₂HPO₄と50 mMのNaH₂PO₄をpH 7.50になるように混合し、この混合液をラテックス希釈用緩衝液として用いた。

【0050】抗AFP抗体：抗AFP抗体として、ウサギの抗血清からイムノグロブリン分画にまで精製したウサギ抗AFP抗体 (1mg/ml、DAKO社製) を用いた。

抗体希釈用緩衝液：上記ラテックス希釈用緩衝液を抗体希釈用緩衝液として用いた。

【0051】ブロッキング用緩衝液：100 mMのNa₂*

*₂ HPO₄と100 mMのNaH₂PO₄をpH 7.40になるように混合し、この混合液にウシ血清アルブミ

ン (Bovine serum albumin Fraction V、Reagent Grade、Miles Corp. 社製) を1% (W/V) になるよう に、またNaN₃ (試薬特級、ナカライトスク社製) を0.1% (W/V) になるように添加したものを、ブロッキング用緩衝液として用いた。

保存用緩衝液：50 mMのNa₂HPO₄と50 mMのNaH₂PO₄をpH 7.40になるように混合し、カザミノ酸 (TIFCO社製) を1% (W/V) になるよ うに、またNaN₃ (試薬特級、ナカライトスク社製) を0.1% (W/V) になるように添加したものを、保

40 存用緩衝液として用いた。

【0052】血清検体：血清検体として、肝臓癌患者お よび健常人の血清を用いた。

AFP標準ヒト血清： AFP標準ヒト血清として、ヒト ブルーパーク (Intergen社製) に対して、予め濃 度を測定したα-フェトプロテイン (DAKO社製) を 希釈添加し、約500、300、150、38、10n g/mlにそれぞれ希釈して使用した。また、血液項目 用標準血清を含まない、生理食塩水のみのものを0ng /mlとした。

【0053】検体希釈用希釈液 (R1液)：上記ブロッキング用緩衝

11

液に、ポリビニルピロリドンK90（平均分子量1,200,000、和光純薬工業社製）を0.5%（W/V）になるように添加したものを検体希釈用希釈液（R1液）として用いた。

【0053】(2) AFP抗体感作ラテックス試薬の調製

上記ボリスチレンラテックス1容に、上記ラテックス希釈用緩衝液3容を添加し、2.5%（W/V）ラテックス液を得た。抗AFP抗体は、タンパク濃度が300μg/mlになるように上記抗体希釈用緩衝液で希釈し、抗体液とした。上記2.5%（W/V）ラテックス液800μlを4℃のインキュベーター内でマグネットターラーで攪拌しながら、ここへ上記抗体液800μlを素早く添加し、4℃にて1時間攪拌した。その後、上*

検体容量

20 μl

検体希釈用希釈液

180 μl

ラテックス試薬

60 μl

測定波長

700 nm

測定温度

37 ℃

【0055】ラテックス試薬を添加してから約80秒後の吸光度と約320秒後の吸光度の差（ΔOD570）を測定し、この吸光度の差を10,000倍したものを吸光度変化量とした。

【0056】検体の代わりに既知濃度のAFP標準品を用いて上記と同様の測定を行って、予め検量線を作成しておき、上清検体の吸光度変化量を上記検量線に外挿して、検体中のAFP量を算出した。

【0057】上記(1)項の全ての検体について、市販のEIA試薬（国際試薬社製）を用いて、検体中のAFP量を測定した。方法は、キット添付の操作法に従って行つた。

【0058】実施例4

上記(1)項の保存用緩衝液の調製において、カザミノ酸の濃度を、0.8%（W/V）したこと以外、実施例3と同様にしてラテックス試薬を調製し、AFP測定を行つた。

【0059】実施例5

上記(1)項の保存用緩衝液の調製において、カザミノ※

*記プロッキング用緩衝液を2.0ml添加し、4℃にて続けて2時間攪拌した。次にこの混合液を15℃、15,000 rpmにて20分間遠心分離した。得られた沈澱に保存用緩衝液2.0mlを添加し、上記と同様に遠心分離をすることにより、沈澱を洗浄した。洗浄操作は3回行った。この沈澱に保存用緩衝液を2.0ml添加し、よく攪拌した後、超音波破碎機にて分散処理を行い、固体分0.30%（W/V）のラテックス試薬を得た。このようにして調製したラテックス試薬を35℃にて6日間インキュベーションした。

【0054】(3) AFP量の測定

ラテックス試薬によるAFP量の測定は、生化学用自動分析装置7150形（日立製作所社製）を用いて行った。測定条件は、次の通りである。

20※酸の濃度を、0.5%（W/V）としたこと以外、実施例3と同様にしてラテックス試薬を調製し、AFP測定を行つた。

【0060】比較例3

上記(1)項の保存用緩衝液の調製において、カザミノ酸の代わりに、ウシ血清アルブミンを用いたこと以外、実施例3と同様にしてラテックス試薬を調製し、AFP測定を行つた。

【0061】比較例4

上記(2)項のラテックス試薬の調製において、35℃の代わりに25℃でインキュベーションしたこと以外は、実施例3と同様にしてラテックス試薬を調製し、AFP測定を行つた。

【0062】実施例3～5及び比較例3・4の結果を、表3及び図2に示した。図2より、実施例では比較例に比べて、低濃度までより高感度に測定可能であることが分かる。

【0063】

【表3】

13

14

検体	A F P量 (ng/mL)					
	実施例3	実施例4	実施例5	比較例3	比較例4	E I A
1	4.9	5.0	5.1	5.0	5.0	5.0
2	4.6	4.7	4.8	4.7	4.7	4.7
3	4.4	4.5	4.6	4.5	4.5	4.5
4	4.1	4.2	4.3	4.2	4.2	4.2
5	3.8	3.9	4.0	3.9	3.9	3.9
6	3.5	3.6	3.7	3.6	3.6	3.6
7	3.2	3.3	3.4	3.3	3.3	3.3
8	2.8	2.9	3.0	3.3	3.4	2.9
9	2.7	2.9	2.8	3.1	3.2	2.8
10	2.6	2.8	2.7	3.2	3.3	2.7
11	2.5	2.4	2.6	2.9	3.2	2.5
12	2.4	2.3	2.5	2.7	2.1	2.4
13	2.3	2.4	2.2	2.7	2.7	2.3
14	2.2	2.3	2.1	2.6	2.8	2.2
15	2.0	2.1	1.9	2.7	2.4	2.0
16	1.1	1.2	1.2	1.7	1.6	1.2
17	1.1	1.0	0.9	1.6	1.4	1.0
18	1.0	1.1	1.1	1.3	1.2	1.1
19	6	5	5	5	5	6
20	8	8	9	1.4	6	9
21	7	9	8	4	7	8
22	6	6	7	1.0	6	7
23	4	4	3	6	3	1
24	6	5	5	8	7	4
25	7	7	7	1.1	1.2	5

【0064】

【発明の効果】本発明によれば、このように、特異的なシグナルの大きさを減ずることなく、バックグラウンド・シグナルを低減することにより低濃度領域まで高感度に、かつ、容易に測定可能な免疫測定試薬の製造方法および得られた免疫測定試薬を用いる免疫測定法が提供される。

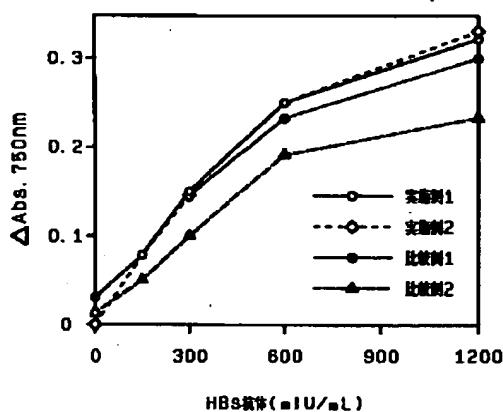
20 * 【図面の簡単な説明】

【図1】標準HBs抗体液の濃度と得られた $\Delta A b s$ の関係を示す検量線を示した図。

【図2】本発明のラテックス凝集法でA F P測定を行った結果とE I A法でA F P測定を行った結果の関係を示す図。

*

【図1】



【図2】

